

Relación entre la germinación del polen "*in vitro*", reacción fluorocromática y tinción con azul de algodón en lactofenol, en dos especies de *Solanum* sec. *Cyphomandropsis*

Lilián M. PASSARELLI¹

Abstract. RELATION BETWEEN POLLEN GERMINATION "*IN-VITRO*", FLUOROCHROMATIC REACTION AND DYE WITH COTTON BLUE IN LACTOFENOL IN TWO *SOLANUM* SEC. *CYPHOMANDROPSIS* SPECIES. The relation between pollen germination "*in-vitro*", fluorochromatic reaction and dye with cotton blue in lactofenol test as indicator of pollen viability in two *Solanum* sec. *Cyphomandropsis* species (*Solanum glaucophyllum* Desf. and *Solanum stuckertii* Bitter) is studied. The statistic analysis proves cotton blue in lactofenol test datam are of scarce value. The fluorochromatic reaction and the germination "*in-vitro*" test don't show significatives differences; the results are similar in the flowers of the first and second day of anthesis in *Solanum glaucophyllum* and in flowers of the second day of *Solanum stuckertii*. Meanwhile the pollen from the first day of anthesis flowers of *Solanum stuckertii* dye an 87% in fluorochromatic reaction, only the 25% of them can germinate "*in vitro*". This study demonstrates that the fluorochromatic reaction manifests the presence of pollen grains with alive cytoplasm, but by germination "*in-vitro*" test the exact percentage of germination is obtained.

Key words. Viability. Fluorochromatic reaction. Pollen. Cultivation "*in vitro*". *Solanum*.

Palabras clave. Viabilidad. Reacción Fluorocromática. Polen. Cultivo "*in vitro*". *Solanum*.

Introducción

Los datos de viabilidad del polen son de indudable valor tanto para el estudio de incompatibilidad y fertilidad, como para la detección de híbridos en poblaciones naturales y la preservación de recursos genéticos.

Estos análisis se basan en el hecho de que los granos no viables poseen dificultades para teñirse o germinar por presentar anomalías en el estado de sus membranas o citoplasma. Por el contrario, los granos viables poseen intacto su material citoplasmático y nuclear tiñéndose rápidamente y logrando germinar. Sin embargo, en varias oportunidades la validez de algunos métodos de tinción ha sido cuestionada (Gamero, 1986, Shivanna y Jhori, 1985).

El presente trabajo es parte del estudio sobre biología floral en especies argentinas de *Solanum* sec. *Cyphomandropsis*. Durante la realización del mismo se pudo observar en etapas experimentales, que los porcentajes de viabilidad obtenidos mediante la técnica de germinación "*in vitro*", reacción fluorocromá-

tica y azul de algodón en lactofenol diferían sobre todo en el caso del polen proveniente de flores del primer día de antesis en *Solanum stuckertii*.

Se pretende, por lo tanto, conocer y comparar los datos de viabilidad obtenidos mediante 2 técnicas de tinción, con el ensayo de germinación "*in vitro*", en este género sudamericano de reconocida importancia económica.

Materiales y métodos

El material utilizado está documentado con los siguientes ejemplares de herbario:

Solanum glaucophyllum Desf., Argentina, Buenos Aires, Ensenada, Passarelli 4-5, 1991 (La Plata).

S. stuckertii Bitter, Argentina, Córdoba, Falda de Reartes, Passarelli 8-9 -1995 (La Plata).

El polen fue obtenido de anteras de material vivo y las pruebas de fertilidad se realizaron en condiciones "estandarizadas". El polen recién colectado y llevado al laboratorio proveniente de flores en el primer o segundo día de antesis fue conservado en dos recipientes y utilizado para los distintos ensayos. Los recuentos se realizaron sobre portaobjetos con cuadrícula, en la que se contaron cuatro cuadrantes ele-

¹Cátedra de Palinología. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Paseo del Bosque s/n. Universidad Nacional de La Plata. 1900 La Plata. Argentina.

Tabla 1. Porcentaje de granos de polen viables según las 3 técnicas utilizadas.

	<i>S.glaucophyllum</i>		<i>S.stuckertii</i>	
	1º día	2º día	1º día	2º día
Reacción	67.1	81.9	75.93	99.30
Fluorocromática	87.6	73.5	92.25	89.80
	66.03	93.69	86.45	74.50
	85.97	86.73	88.69	91.04
Promedio	80,06	76,85	87,15	91,06
Azul de algodón en lactofenol.	98.86	98.04	87.03	99.78
	98.91	99.35	99.70	99.98
	99.78	99.10	94.50	99.60
	99.85	99.75	86.89	98.40
Promedio	99,35	99,06	92,03	99,44
"In Vitro"	67,06	93,40	23,98	94,28
	73,18	72,91	23,52	89,27
	85,82	72,88	28,12	95,54
	82,70	69,56	25,00	84,40
Promedio	77,19	77,19	25,16	90,87

gidos al azar, en cada repetición. Se realizaron tres tratamientos, con cuatro repeticiones cada uno. Los tratamientos fueron aplicados a dos muestras diferentes: A, flores del primer día de antesis; B, flores del segundo día de antesis.

Las técnicas utilizadas para precisar la fertilidad de granos de polen son las siguientes: 1. Tinción con azul de algodón en lactofenol (D'Sousa, 1972): El material fue colocado sobre un portaobjetos con una gota de colorante. Al cabo de 30 minutos se observó el grado de tinción. Se consideran viables los granos con el citoplasma teñido azul intenso. 2. Reacción fluorocromática (FCR, Greissl, 1989): Los granos de polen fueron montados en diacetato de fluoresceína (compuesto no polar y no fluorescente) que penetra rápidamente en el citoplasma polínico y es hidrolizado por esterasas, dejando libre la fluoresceína, polar y fluorescente. Si la membrana del grano de polen está intacta, la fluoresceína se acumula en el citoplasma dando fluorescencia verde-amarillenta bajo microscopio de fluorescencia. Si la membrana de la célula vegetativa no es funcional, la fluoresceína pasa rápidamente al medio de montaje. En este caso, las observaciones fueron realizadas con luz UV y filtro azul, con una longitud de onda de 450 nm. 3. Germinación de polen "in vitro" (Stanley y Linskens, 1974): El medio utilizado fue agar con el agregado del 10% de sacarosa y 0,01 % de ácido bórico. Se contaron 200 granos de polen considerando como germinados aquellos cuyo tubo polínico excedía en longitud un diámetro y medio del mismo.

En todos los casos se aplicó el Análisis de Varianza, para el 5% y 1% de probabilidades y el Test de Tukey.

Resultados

Como se observa en la tabla 1 el porcentaje de viabilidad de *Solanum glaucophyllum* y *S. stuckertii* es elevado en la mayoría de los tratamientos, oscilando entre el 76 % y 99 %, excepto en el porcentaje de germinación "in vitro" correspondiente al polen de flores del primer día de antesis de *Solanum stuckertii*. El valor en este caso disminuye al 25 %.

El análisis de varianza demuestra que los resultados obtenidos en todos los casos son significativos al nivel del 1 % de probabilidades (tabla 2).

Cuando se comparan los promedios de los tres tratamientos realizados mediante el test de Tukey, se observan diferencias significativas entre la tinción con azul de algodón y las otras dos técnicas. La reacción fluorocromática y la germinación "in vitro" no presentan diferencias estadísticas entre sí.

Los resultados de los tres ensayos tienen patrones similares en ambas especies. La viabilidad aparente es mayor en los granos tratados con azul de algodón, intermedia en los tratados con fluorescencia y menor en el caso de germinación "in vitro".

Discusión y conclusiones

Los ensayos de tinción para determinar la viabilidad potencial de los granos de polen son utilizados comunmente debido a su simplicidad. La validez de algunos es cuestionable pues pueden conducir a resultados erróneos, según cual de ellos se utilice. En el trabajo sobre *Tripogandra diurética*, Gamero (1986) observa una importante diferencia en los resultados entre la tinción con fucsina ácida en lactofenol y la germinación "in vitro".

Los datos obtenidos en el presente trabajo mediante la tinción con azul de algodón en lactofenol indican que esta técnica es poco confiable. Según Dravert (1968) y Clark (1973), (en Greissl, 1989) este colorante reacciona con la calosa de los granos de polen no viables.

Entre las técnicas de tinción la reacción fluorocromática (RFC) es una de las que aportan mejores resultados y "debe ser clasificada como una reacción biológica de germinación" (Greissl, *op. cit.*). Esta técnica es utilizada principalmente en especies con polen 3-celular que presenta dificultades para germinar "in vitro". Resultados satisfactorios se citan para Crucíferas, Compuestas y Gramíneas (Heslop Harrison y Heslop Harrison, 1970).

Los resultados del análisis de varianza establecen que las diferencias entre la reacción fluorocromática y la germinación "in-vitro" tanto en *Solanum glaucophyllum* como en *S. stuckertii* no son significativas. Sin embargo los resultados de la germinación

Tabla 2. Análisis de varianza de los tres tratamientos de viabilidad en *Solanum glaucophyllum* y *Solanum stuckertii*.

		Solanum glaucophyllum						Solanum stuckertii						
Fuente de Variación	Grado de libertad	Flores 1er. día Antesis			Flores 2do. día Antesis			Flores 1er. día Antesis			Flores 2do. día Antesis			Ft
		Sc	Cm	Fc	Sc	Cm	Fc	Sc	Cm	Fc	Sc	Cm	Fc	
Tratamiento	2	1,161.87	580.93	8,70**	1,295.74	647.87	9,77**	11,119.285	559.64	154,43**	191.55	95.77	4,9**	5%, 3,86
Error	9	600.63	66.73		596.43	66.27		324.05	36.0		175.7	19.52		1%, 6.99
Total	11	1,762.50			1892.17			11,443.33			367.25			

** Valor significativo al nivel del 1%

Sc = Suma de Cuadrados

Cm = Cuadrado Medio

Fc = Valor de F calculado

"in-vitro" en *S. stuckertii* revelan diferencias interesantes para los estudios reproductivos, no evidentes mediante las otras técnicas. Se demuestra que sólo el 25 % de los granos de polen de las flores del primer día de antesis, germinan. Este dato es importante si se tiene en cuenta que el polen puede ser utilizado para polinización a partir del 40% de viabilidad (Stanley y Linskens, 1974). Se observa además, que estos resultados se relacionan, en *S. stuckertii*, con la presencia de estructuras de la antera que impiden la salida del polen durante el primer día de antesis y que se retiran durante el segundo día cuando este adquiere la capacidad de germinar (Passarelli, 1998). El ensayo de germinación "in-vitro" es por lo tanto el más completo cuantitativamente.

Queda demostrado mediante los resultados de viabilidad obtenidos, que la técnica con azul de algodón en lactofenol aporta datos poco confiables. Por otra parte la reacción fluorocromática manifiesta la presencia de un microgametofito con citoplasma vivo en condiciones de germinar. Sin embargo, mediante la prueba de germinación "in vitro" se obtienen los resultados más confiables, estando la técnica que se elija en relación con el grado de confiabilidad que se pretende obtener.

Agradecimientos

Deseo agradecer al ingeniero agrónomo Marcelo Estévez, de la Cátedra de Cálculo Estadístico y Biometría, Facultad de Ciencias Agrarias, UNLP, por su asesoramiento en el tema estadístico. También agradezco al Dr. J.C. Gamero por los valiosos comentarios aportados en calidad de árbitro.

Bibliografía

- D'Souza, L. 1972. Staining pollen tubes in the styles of cereals with cotton blue fixation by ethanol-lactic acid for an enhanced differentiation. *Stain Technology* 47: 107-108.
- Gamero, J.C. 1986. Dimorfismo y viabilidad del polen en *Tripogandra diurética* (Commelinaceae). *Darwiniana* 27: 143-152.
- Greissl, R. 1989. Viability Analysis of monadic and polyadic Pollen Grains using Optical Contrast-Fluorescence Microscopy. *Scientific and Technical information* 9: 180-184.
- Heslop Harrison, J. y Heslop Harrison, Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain technology* 45: 115-120.
- Passarelli, L. 1998. [Estudios sobre Biología Floral en especies de *Solanum* sec. *Cyphomandropsis*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de la Plata, ??? p. Inédito].
- Shivanna, K.P. y Jhori, B.M. 1985. *The Angiosperm Pollen. Structure and Function*. (eds.) John Wiley & Sons Editores, 374 p.
- Stanley, R.G. y Linskens, H. 1974. *Pollen: Biology, Biochemistry, Management*. Springer-Verlag-Berlin-New York, 307 p.

Recibido: 1 de agosto de 1998

Aceptado: 26 de febrero de 1999